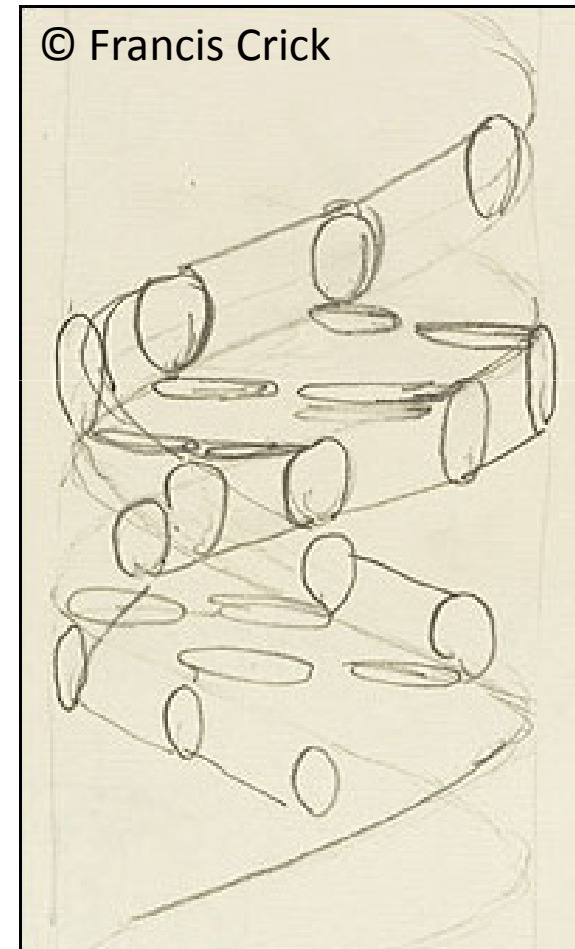


6. DNA - Bakteriengenetik

Konzepte:

- ➡ DNA Struktur
- ➡ DNA Replikation
- ➡ Gentransfer in Bakterien
- ➡ Bakteriophagen



2. Welcher der folgenden Sätze entspricht der Chargaff-Regel?

A) Die Menge von Purinen (T und C) entspricht der Menge an Pyrimidinen (A und G).

B) Die Menge von Purinen (T und A) entspricht der Menge an Pyrimidinen (C und G).

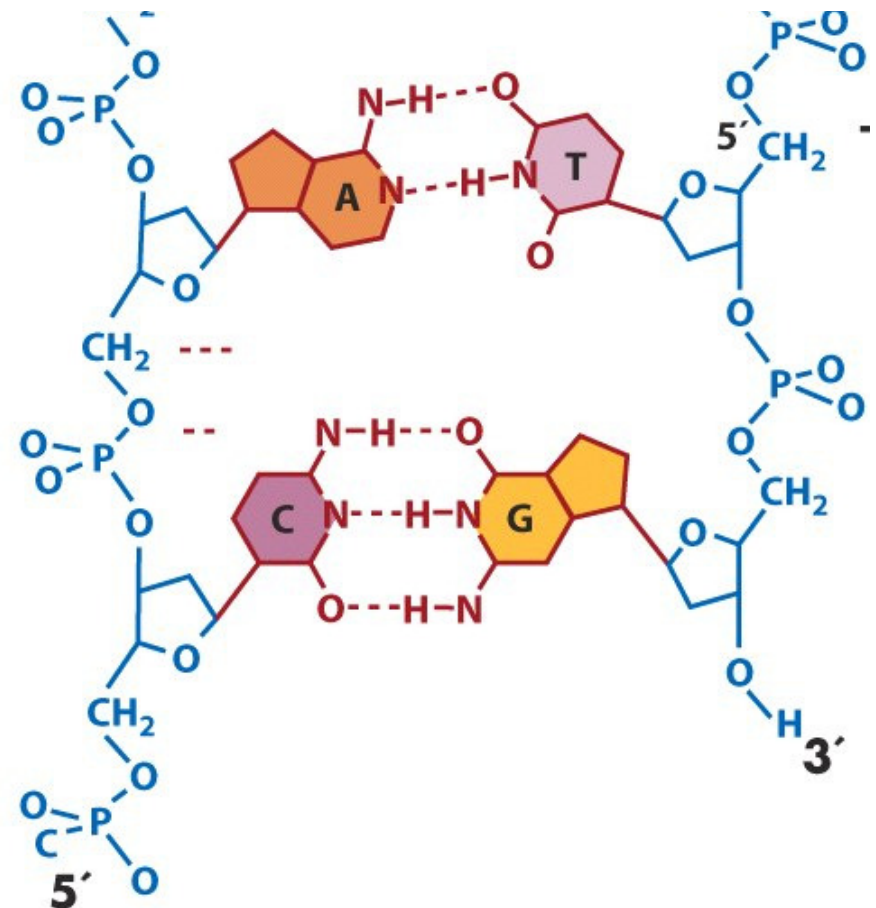
☒ C) Die Menge eines einzelnen Nukleotids bestimmt nicht die Menge der anderen Nukleotide.

D) Die Mengen aller Nukleotide sind gleich.

E) Keiner der obigen Sätze.

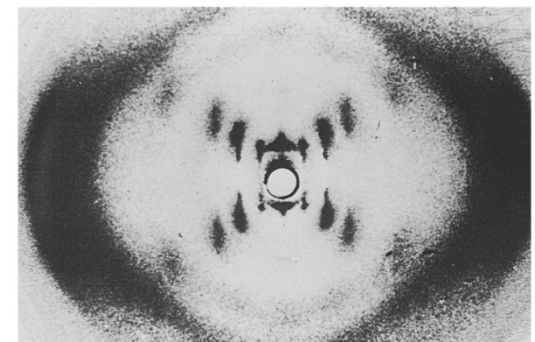
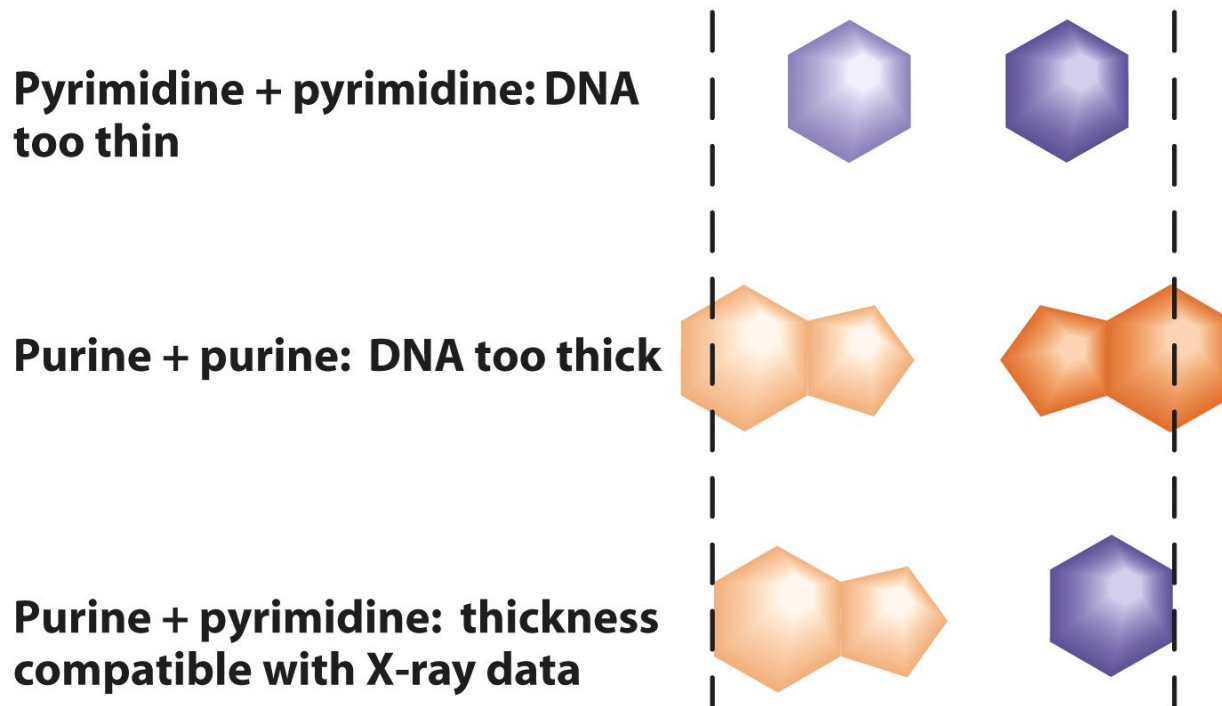
Erwin Chargaff:

1. Die Gesamtmenge der Pyrimidinnukleotide (T+C) entspricht der der Purinnukleotide (A+G)
2. Die Menge an T ist immer = A
3. C = G

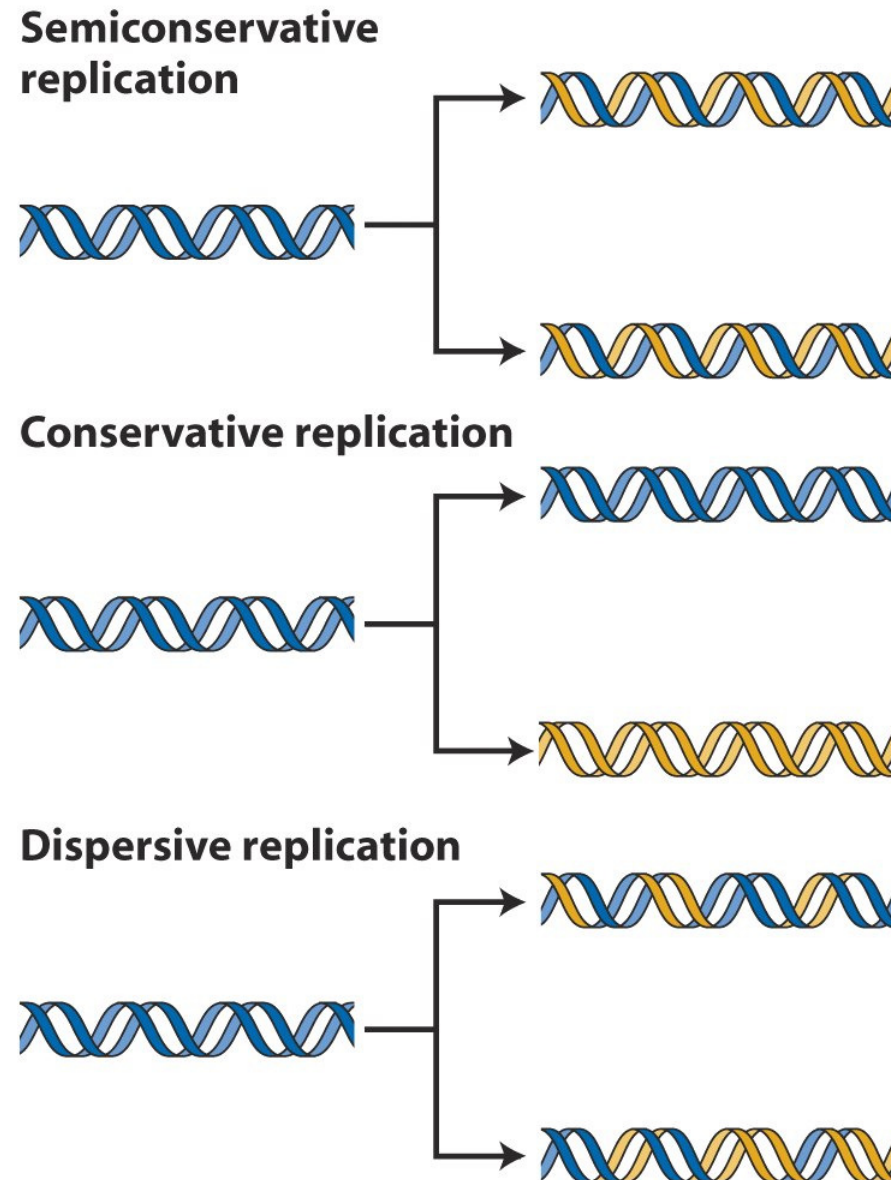


2. Welcher der folgenden Sätze entspricht der Chargaff-Regel?

- A) Die Menge von Purinen (T und C) entspricht der Menge an Pyrimidinen (A und G).
- B) Die Menge von Purinen (T und A) entspricht der Menge an Pyrimidinen (C und G).
- C) Die Menge eines einzelnen Nukleotids bestimmt nicht die Menge der anderen Nukleotide.
- D) Die Mengen aller Nukleotide sind gleich.
- E) Keiner der obigen Sätze.

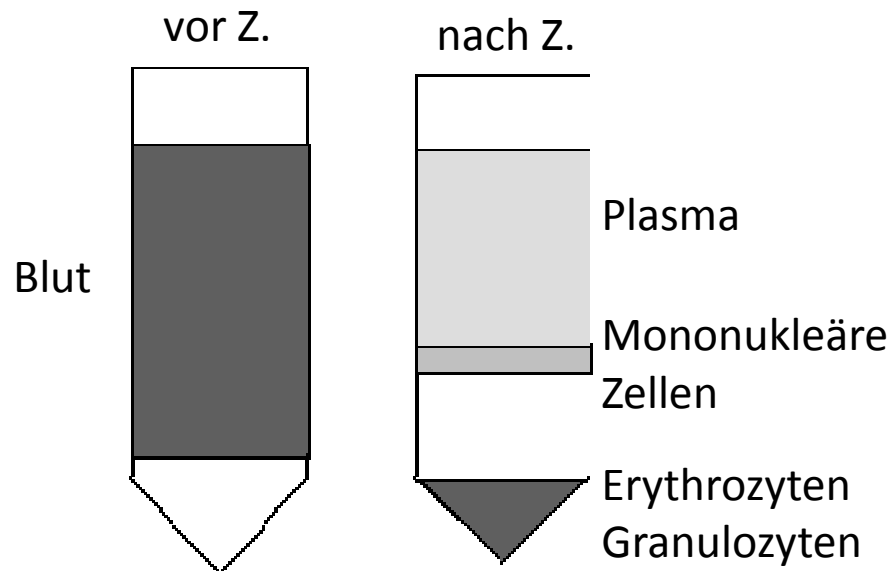


3. Durch welches Experiment wurde gezeigt, dass die DNA-Replikation semikonservativ erfolgt?

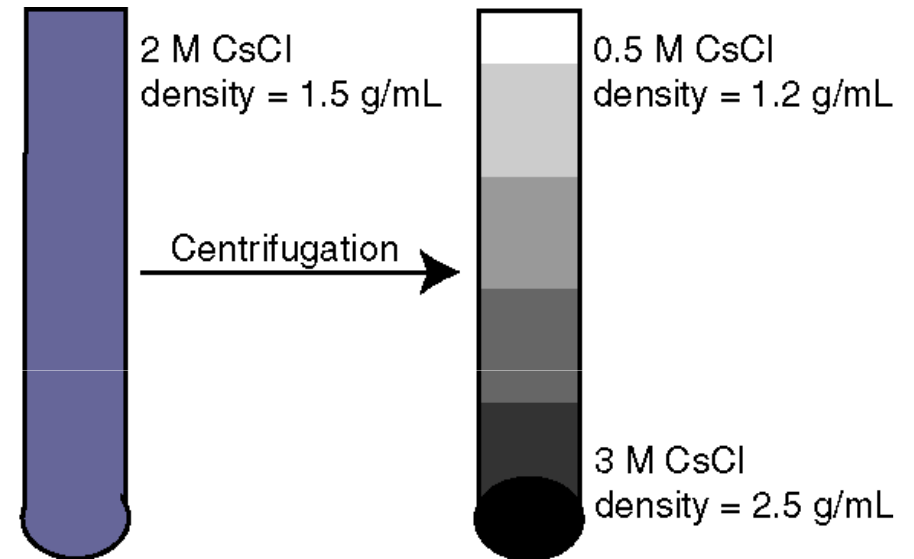


Dichtegradientenzentrifugation

Beispiel Blut:



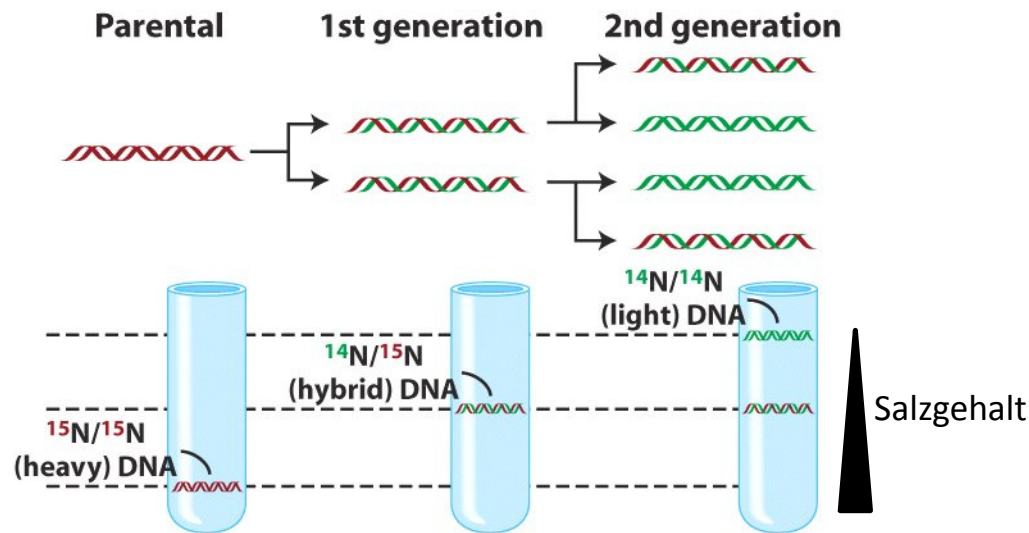
Beispiel Cäsiumchlorid:



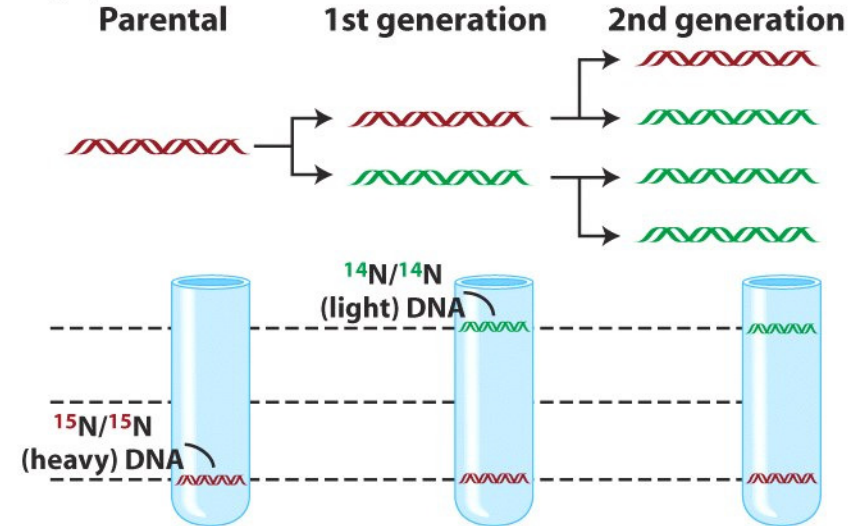
Meselson und Stahl (1958):

1. ^{15}N -DNA Zellen in ^{14}N -Medium
2. Nach erster Zellteilung zentrifugieren
3. Nach zweiter Zellteilung zentrifugieren

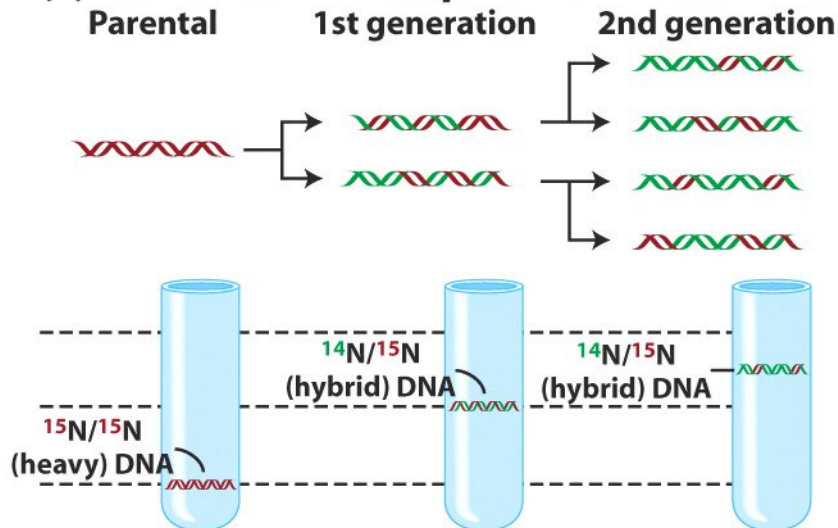
(a) Predictions of semiconservative model



(b) Predictions of conservative model



(c) Predictions of dispersive model



“The most beautiful experiment in biology.”
[John Cairns]

(a) Predictions of semiconservative model

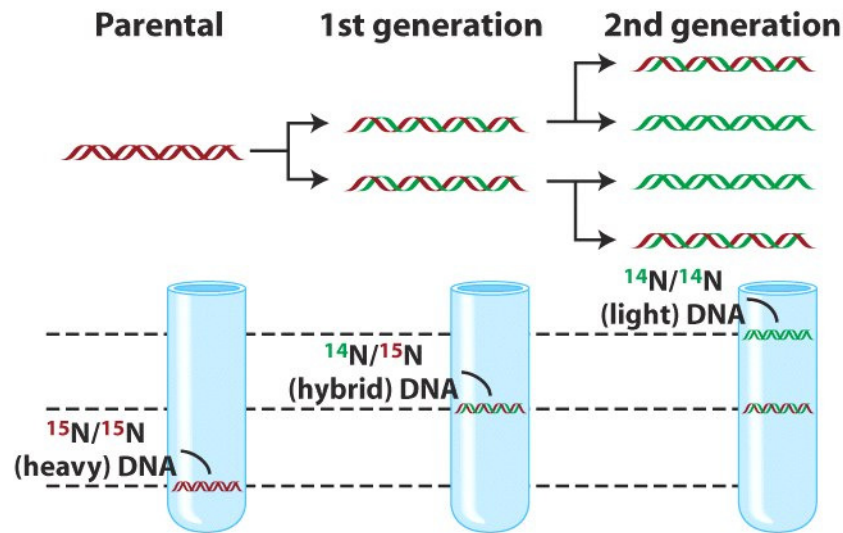
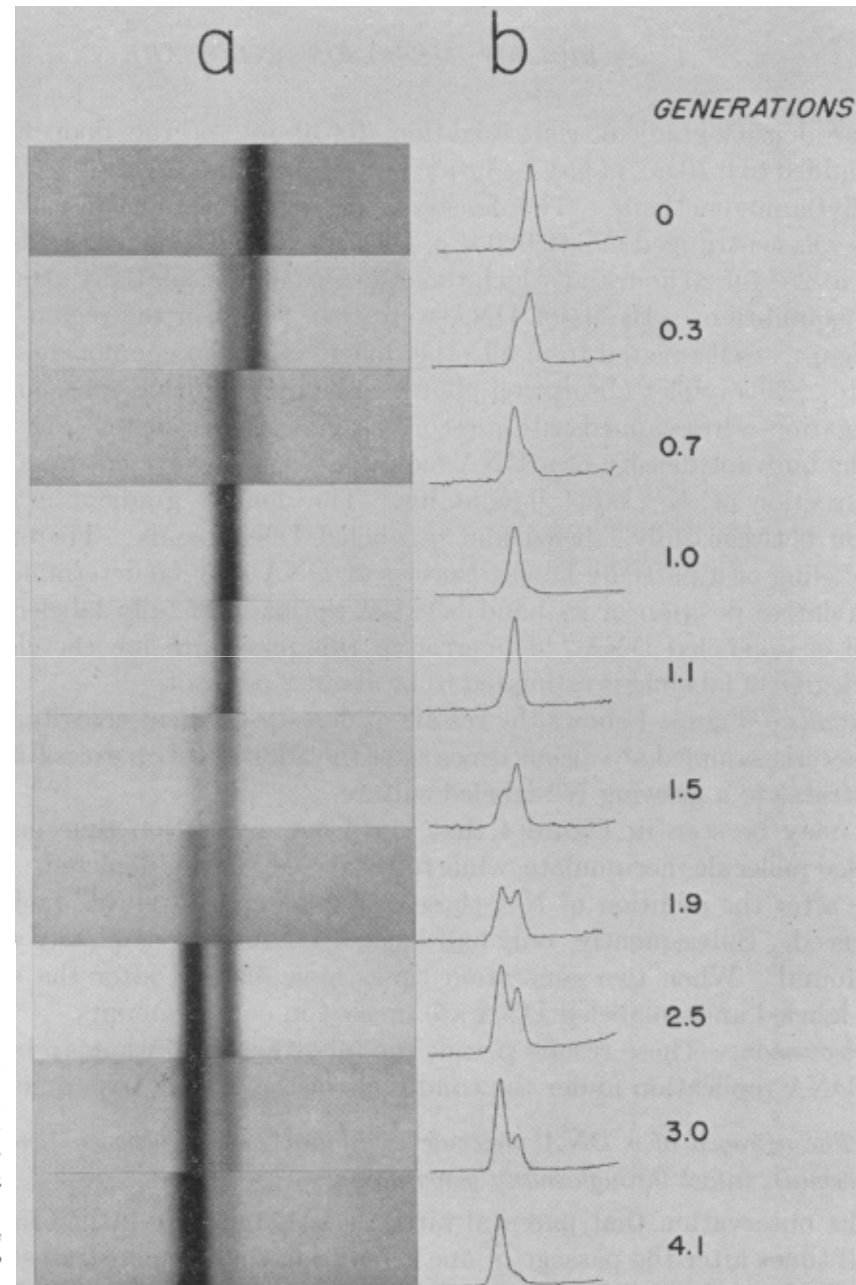
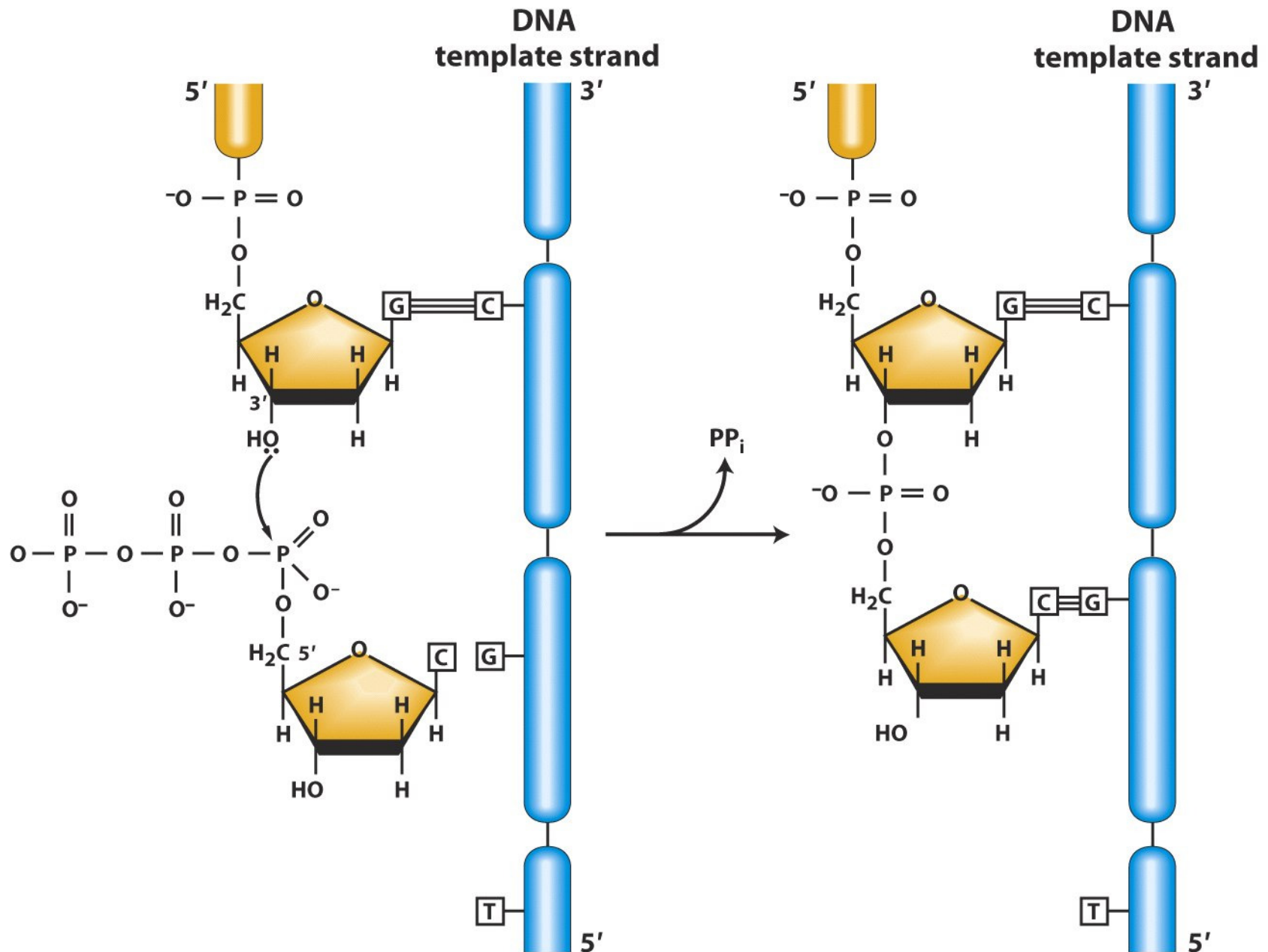


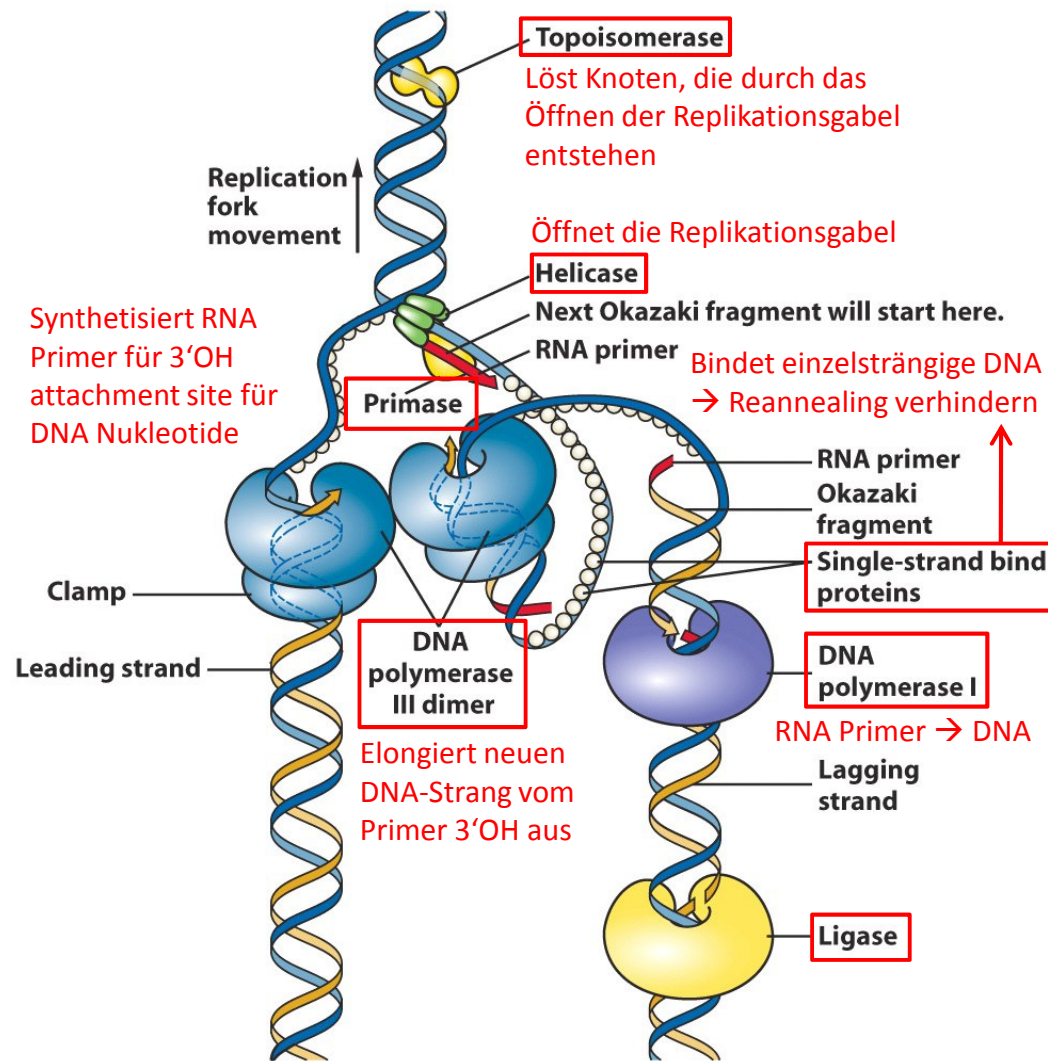
FIG. 4—*a*: Ultraviolet absorption photographs showing DNA bands resulting from density-gradient centrifugation of lysates of bacteria sampled at various times after the addition of an excess of N^{14} substrates to a growing N^{15} -labeled culture. Each photograph was taken after 20 hours of centrifugation at 44,770 rpm under the conditions described in the text. The density of the CsCl solution increases to the right. Regions of equal density occupy the same horizontal position on each photograph. The time of sampling is measured from the time of the addition of N^{14} in units of the generation time. The generation times for Experiments 1 and 2 were estimated from the measurements of bacterial growth presented in Fig. 3. *b*: Microdensitometer tracings of the DNA bands shown in the adjacent photographs. The microdensitometer pen displacement above the base line is directly proportional to the concentration of DNA. The degree of labeling of a species of DNA corresponds to the relative position of its band between the bands of fully labeled and unlabeled DNA shown in the lowermost frame, which serves as a density reference. A test of the conclusion that the DNA in the band of intermediate density is just half-labeled is provided by the frame showing the mixture of generations 0 and 1.9. When allowance is made for the relative amounts of DNA in the three peaks, the peak of intermediate density is found to be centered at 50 ± 2 per cent of the distance between the N^{14} and N^{15} peaks.



1. Zeichnen Sie eine Replikationsgabel bei *E. coli*. Kennzeichnen Sie dabei die alten und neuen DNA-Stränge sowie die Position der Primer.



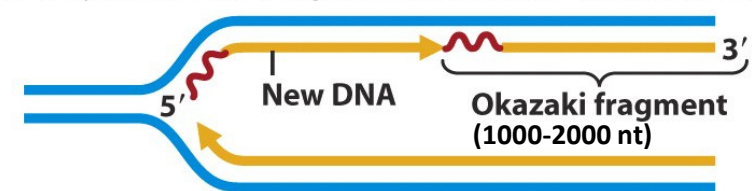
1. Zeichnen Sie eine Replikationsgabel bei *E. coli*. Kennzeichnen Sie dabei die alten und neuen DNA-Stränge sowie die Position der Primer.



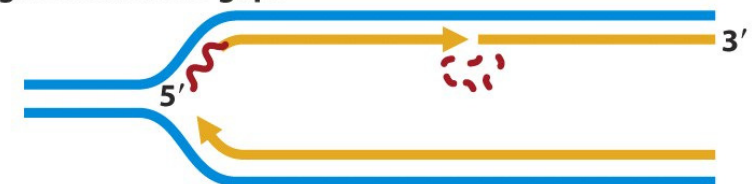
1. Primase synthesizes short RNA oligonucleotides (primer) copied from DNA.



2. DNA polymerase III elongates RNA primers with new DNA.



3. DNA polymerase I removes RNA at 5' end of neighboring fragment and fills gap.

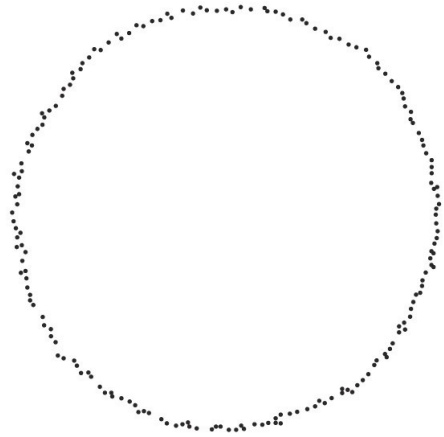


4. DNA ligase connects adjacent fragments.

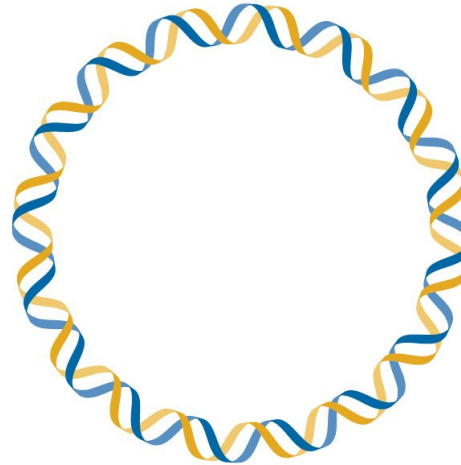


Replizierendes Bakterienchromosom

Chromosome after one round of replication



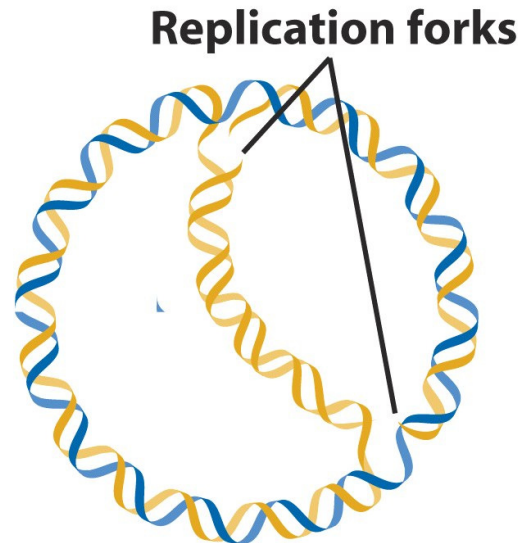
Autoradiograph



Interpretation



Autoradiograph

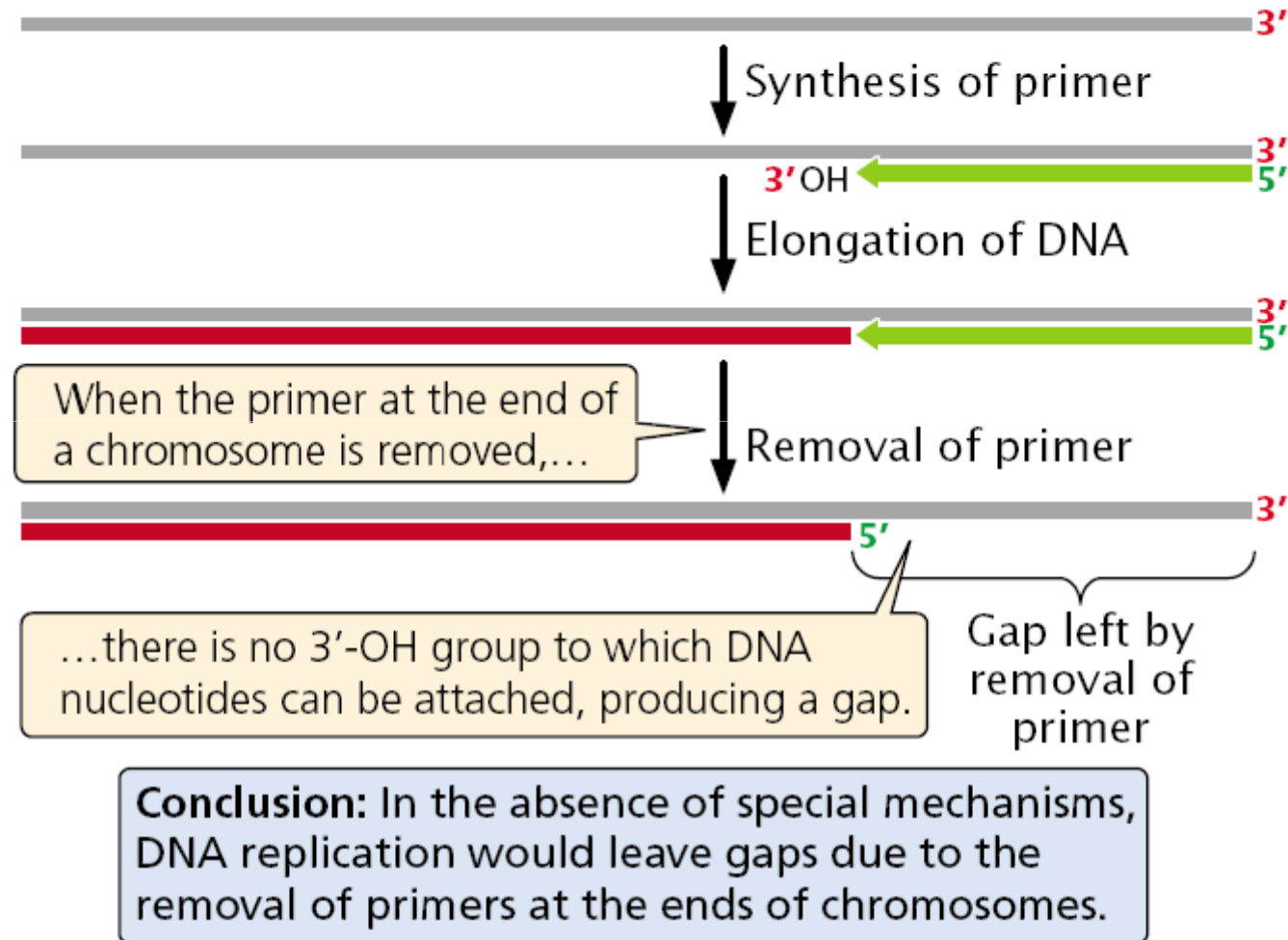


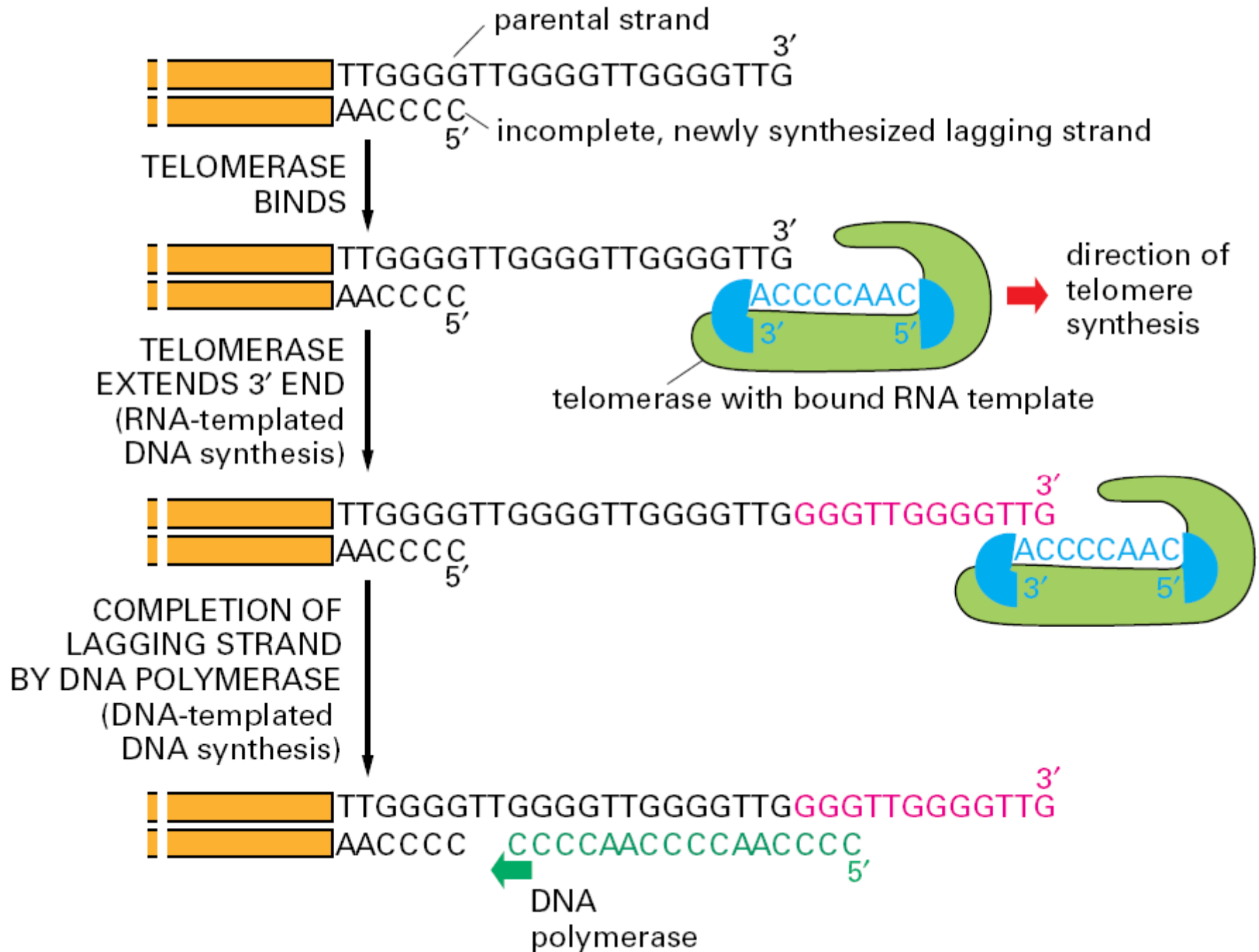
Interpretation

John Cairns, 1963

4. Wie werden bei Eukaryoten Telomere repliziert?

Problem: verschieden lange Chromosomenenden!





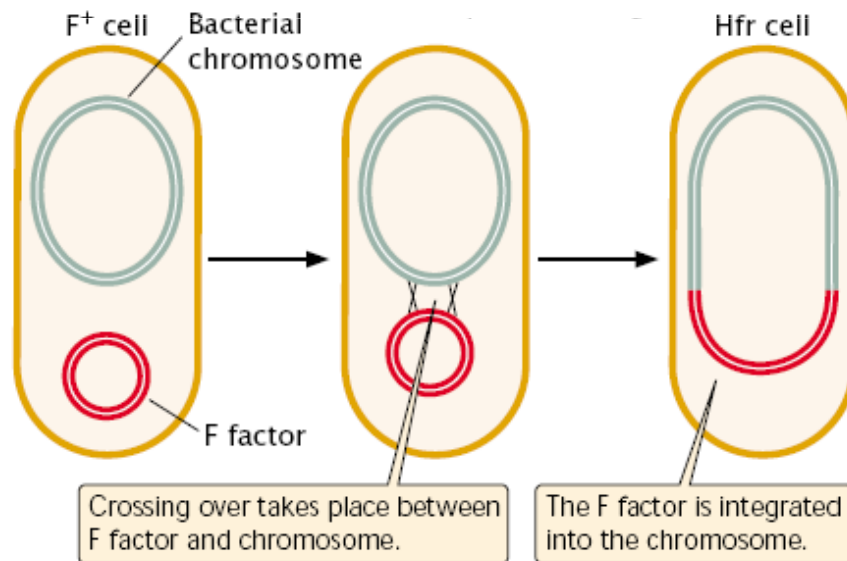
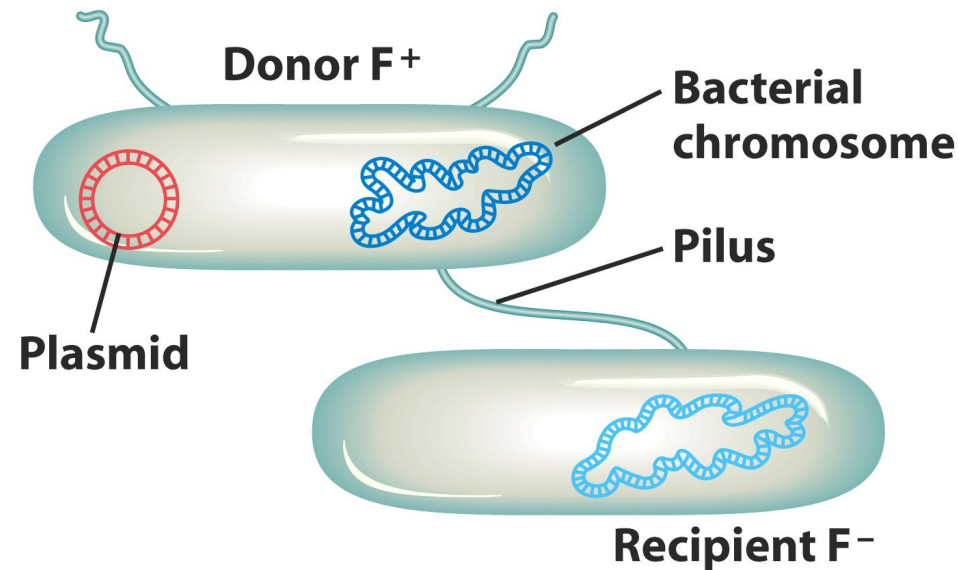
5. Wie liegt der F-Faktor in Hfr-, F⁺, F⁻ und F'-Stämmen vor?

F-Faktor:

Die Fähigkeit genetisches Material auf andere Bakterien zu übertragen.

F-Plasmide des Donors regulieren die Synthese von Pili, die den Kontakt mit den Empfängerzellen initiieren

→ Porenbildung für DNA-Transfer



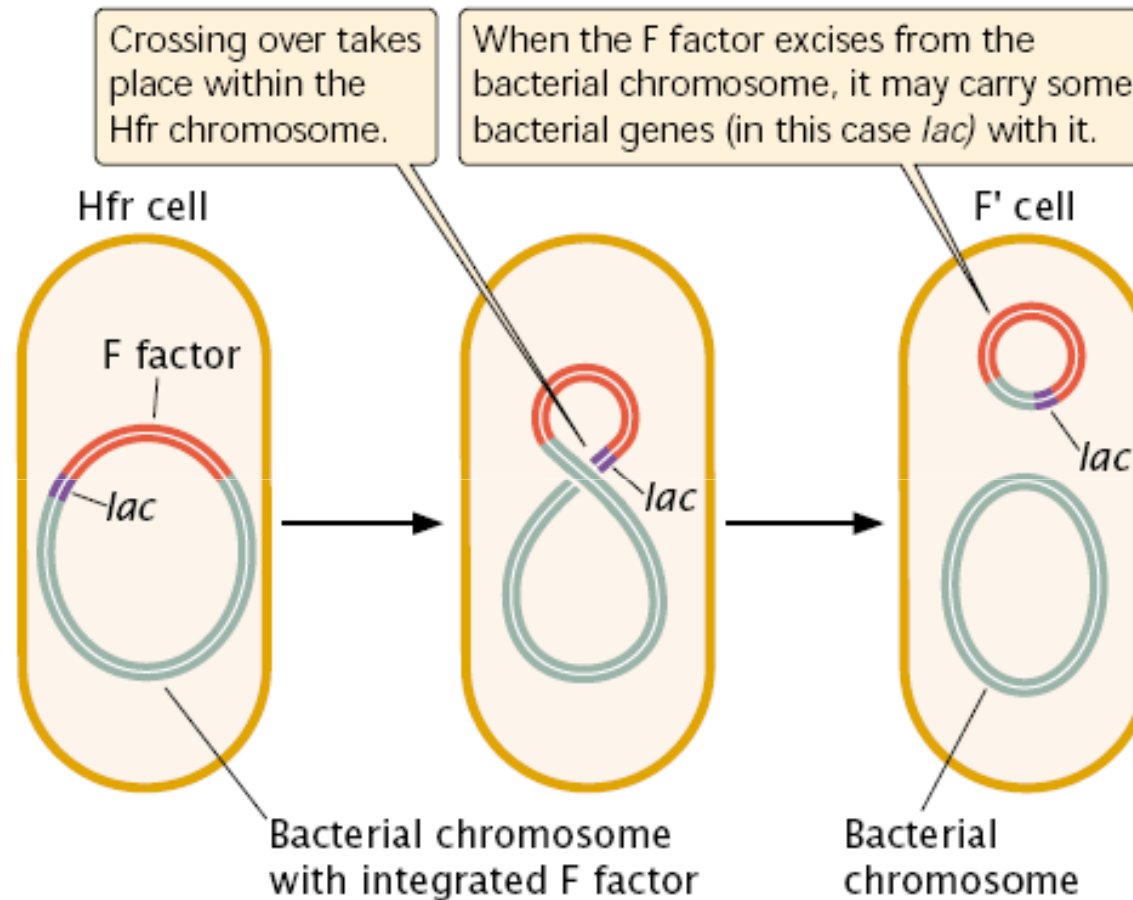
The F factor is integrated into the bacterial chromosome in an Hfr cell.

In **F⁺-Donorstämmen** liegt der F-Faktor als extrachromosomales Plasmid vor.

In **F⁻-Empfängerstämmen** existiert kein F-Faktor.

Hfr-Stämme haben den F-Faktor in ihr Wirtsgenom integriert.

In **F'**-Stämmen wurde der F-Faktor wieder aus dem Hfr-Chromosom herausgeschnitten und liegt als rekombinantes F-Plasmid im Cytoplasma vor:



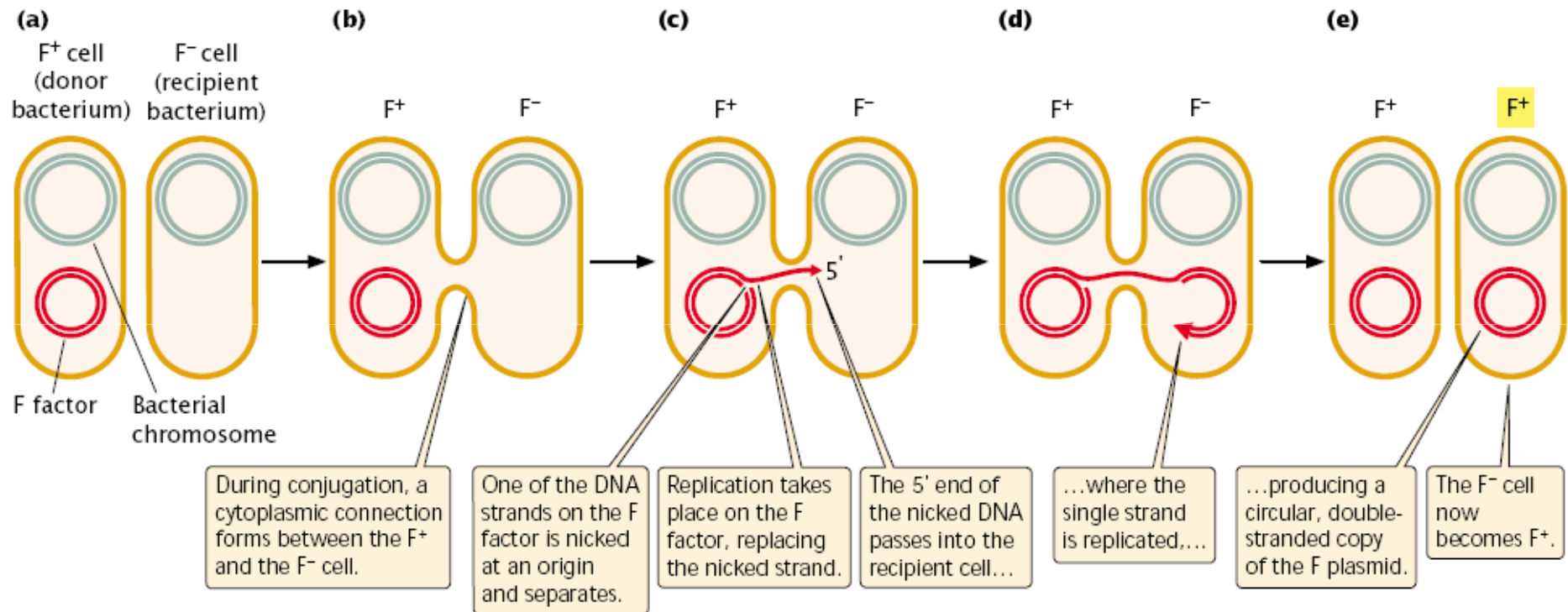
An Hfr cell may be converted into an F cell when the F factor excises from the bacterial chromosome and carries bacterial genes with it.

6. Welche Möglichkeiten des Gentransfers bei Bakterien kennen Sie?

<u>Konjugation</u>	Transfer von DNA zwischen zwei Bakterien über <i>direkten Zellkontakt</i>
<u>Transformation</u>	DNA wird aus <i>umgebendem Medium</i> aufgenommen und ins Genom integriert
<u>Transduktion</u>	Transfer von einem Bakterium zu einem anderen über einen <i>Virus</i>

6. Welche Möglichkeiten des Gentransfers bei Bakterien kennen Sie?

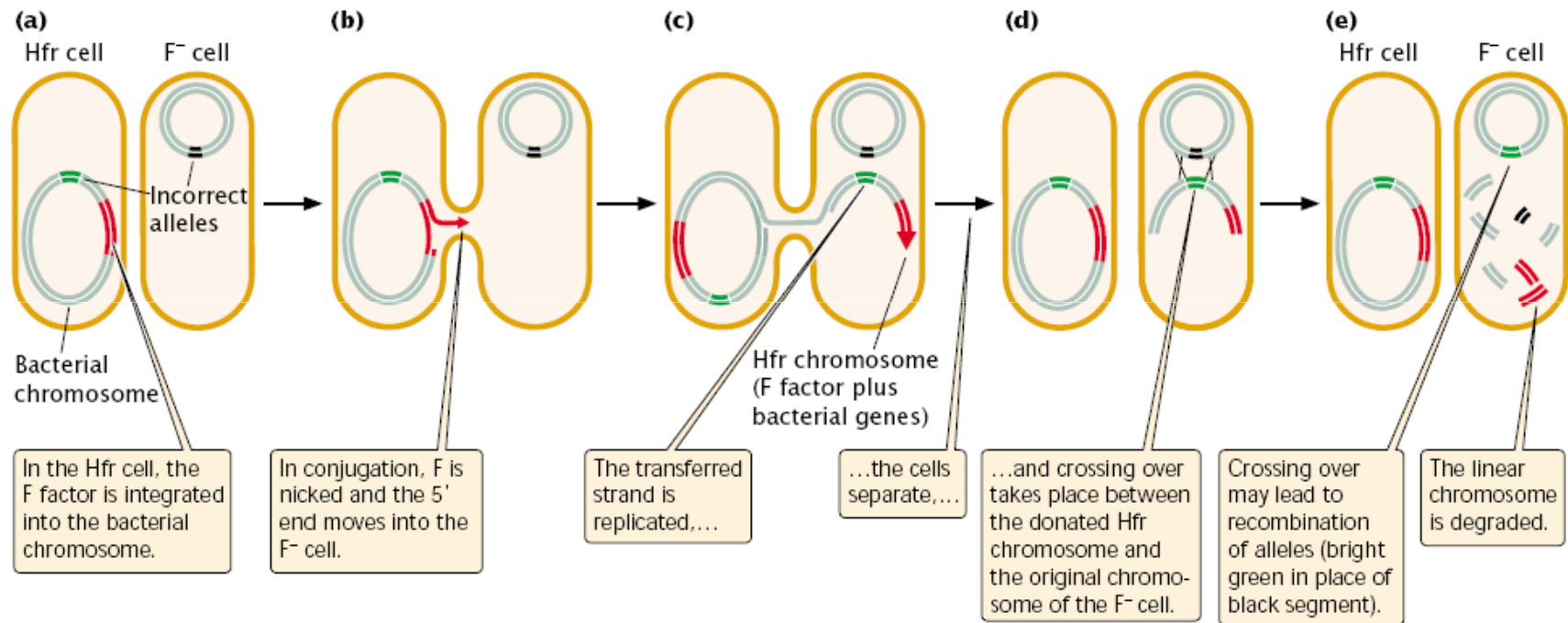
Konjugation A: F^+ Zelle überträgt F-Faktor auf F^- Zelle



6. Welche Möglichkeiten des Gentransfers bei Bakterien kennen Sie?

Konjugation B:

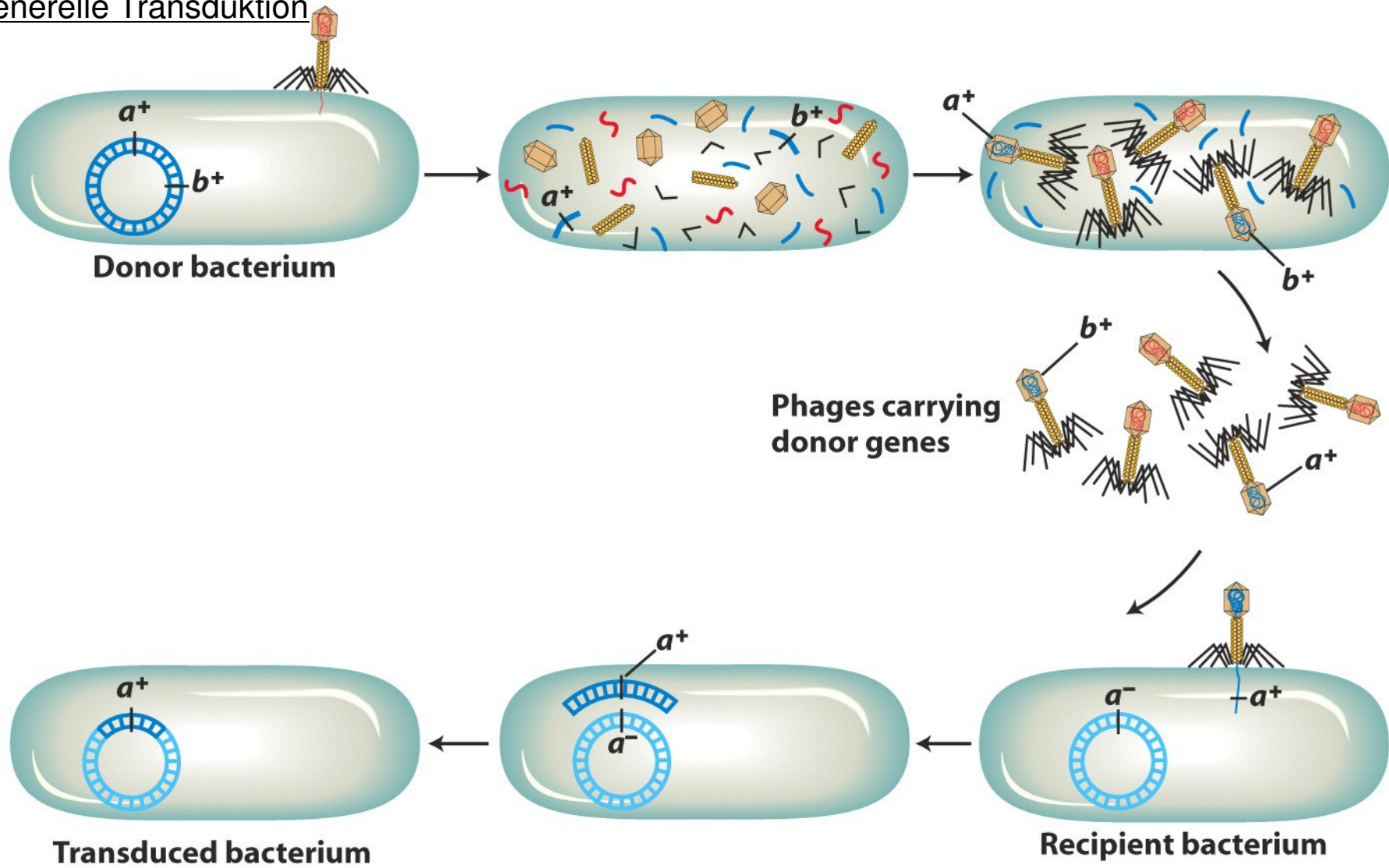
Hfr Zelle überträgt Teile des Genoms auf F⁻ Zelle



Bacterial genes may be transferred from an Hfr cell to an F⁻ cell in conjugation.

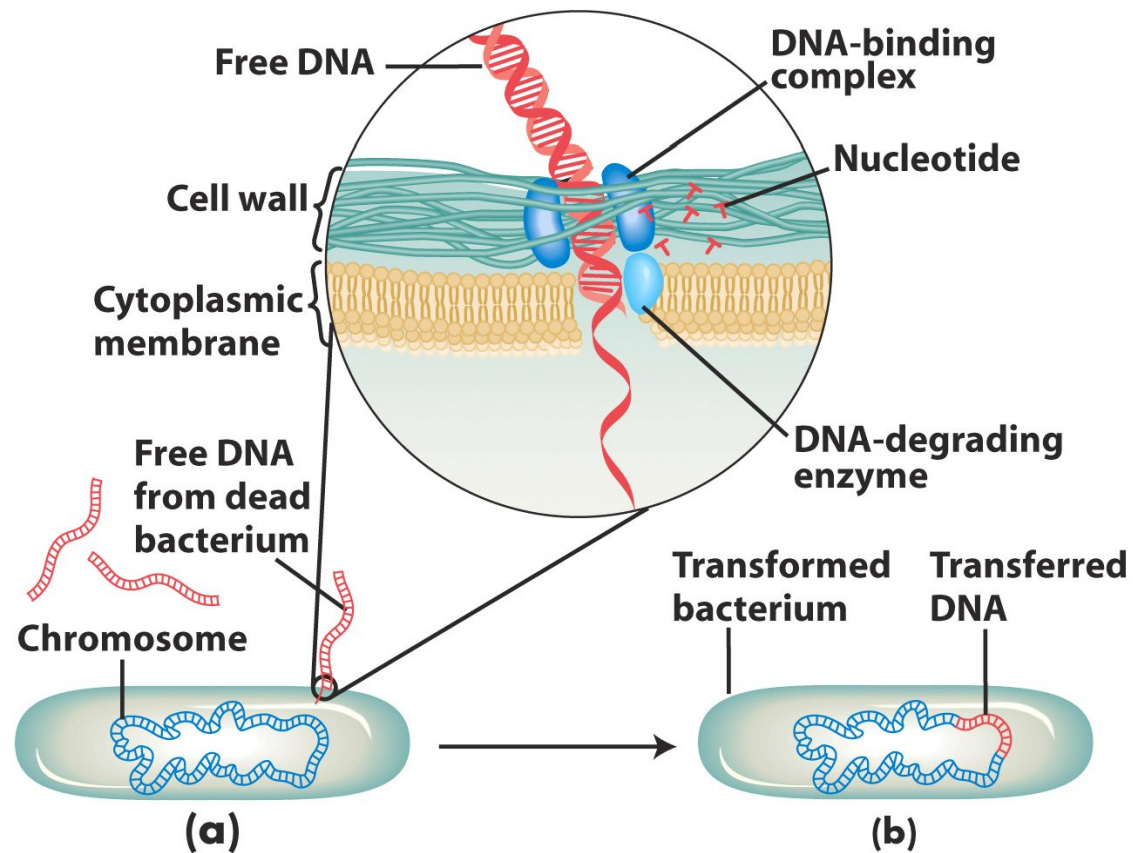
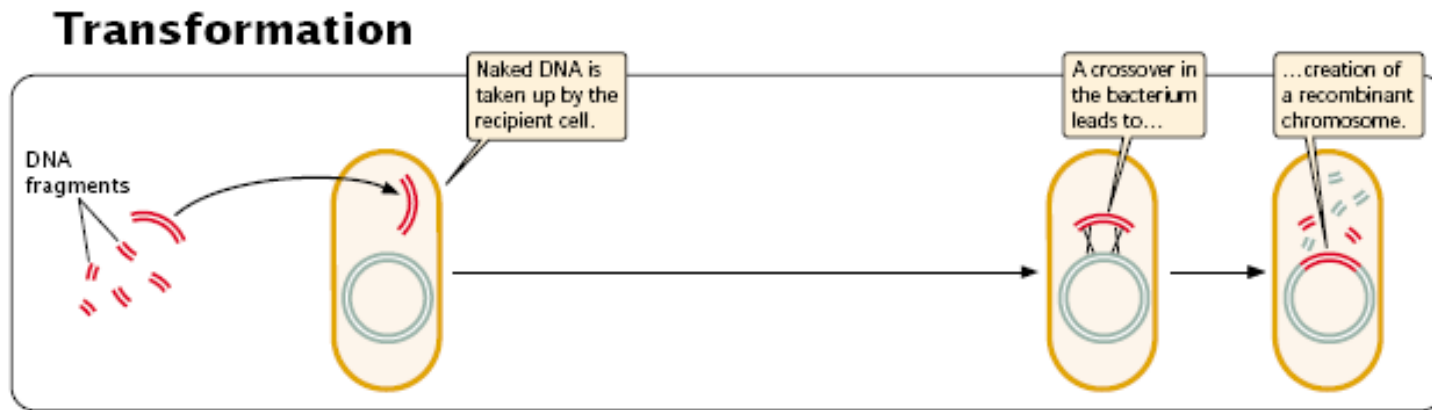
6. Welche Möglichkeiten des Gentransfers bei Bakterien kennen Sie?

Generelle Transduktion



6. Welche Möglichkeiten des Gentransfers bei Bakterien kennen Sie?

Transformation:



6. Welche Möglichkeiten des Gentransfers bei Bakterien kennen Sie?

Konjugation, Transformation und Transduktion sind drei Prozesse zum Gentransfer in Bakterien.

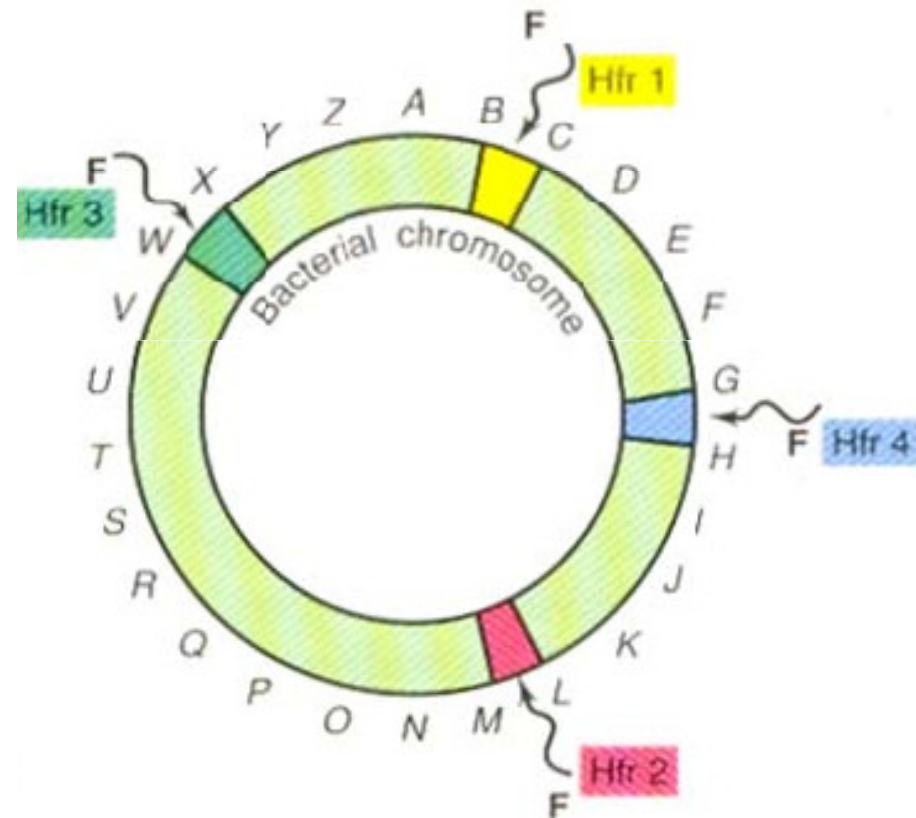
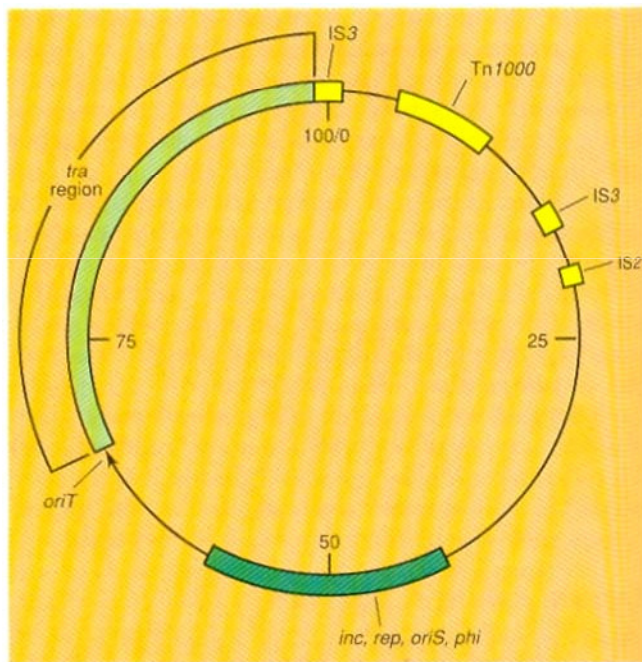
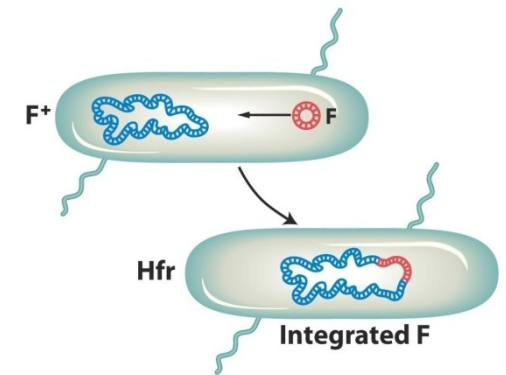
Alle drei* Prozesse beinhalten, dass die transferierte DNA mit dem bakteriellen Chromosom rekombiniert, um stabil ins Wirtsgenom integriert zu werden!

*bis auf F⁺ - F⁻ Konjugation

7. Wie und wo integriert der F-Faktor ins bakterielle Chromosom?

Wo?

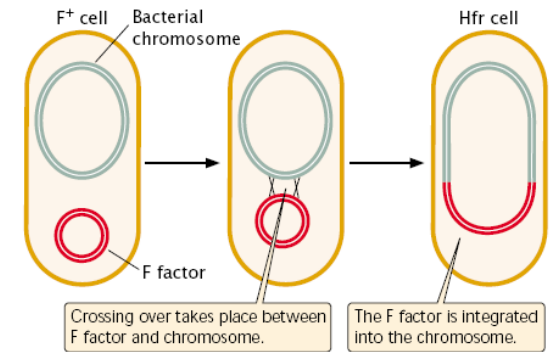
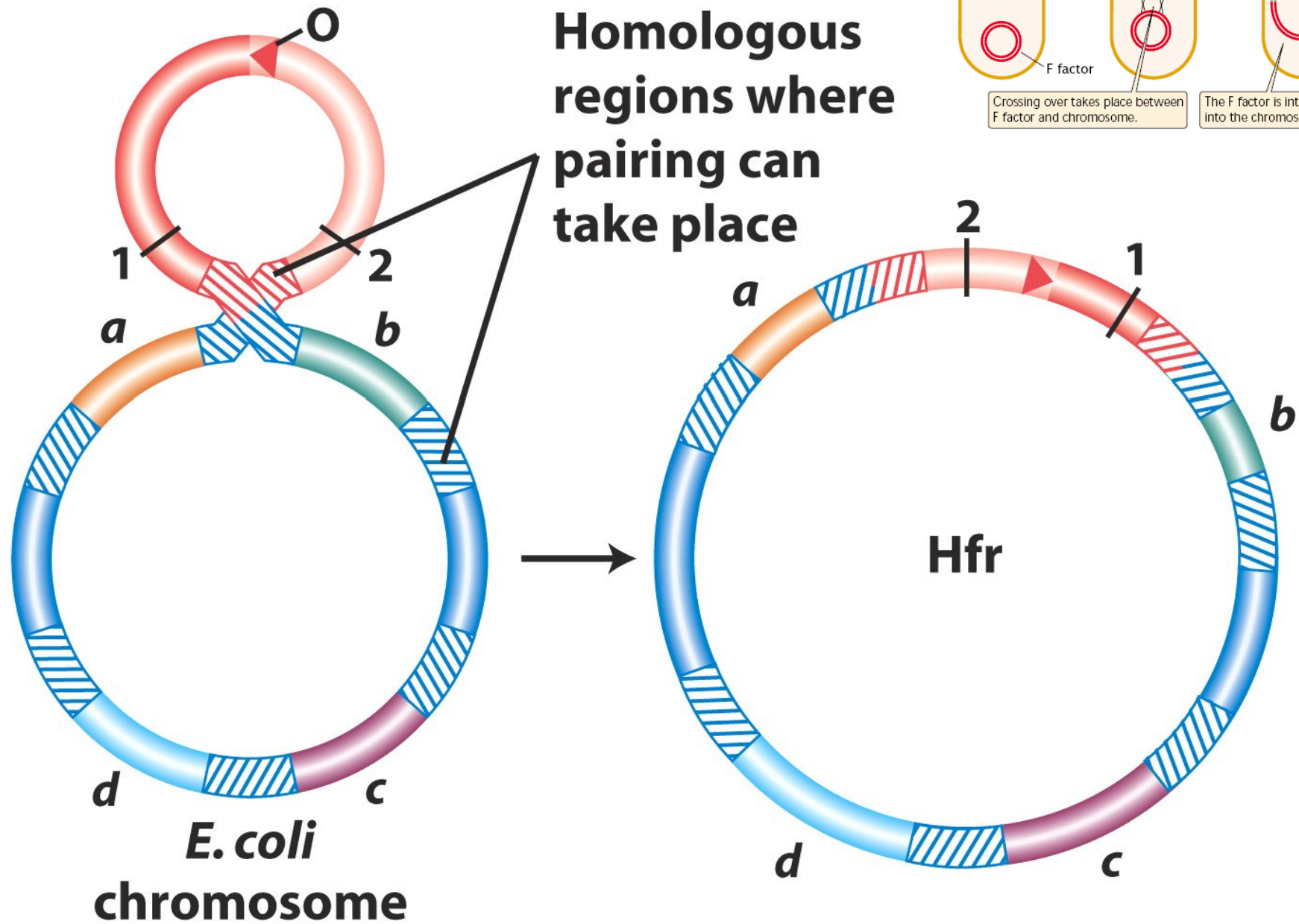
Integration des F-Plasmiden ins eigene Bakterienchromosom → Hfr:



Spezifische Stellen im Bakterienchromosom sind homolog zum F-Plasmid → **'Integration Sites'**

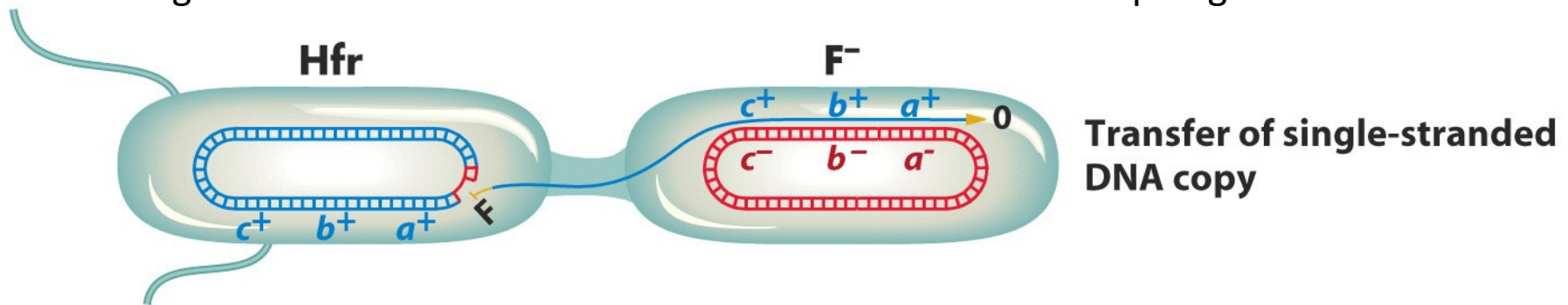
7. Wie und wo integriert der F-Faktor ins bakterielle Chromosom?

Wie?



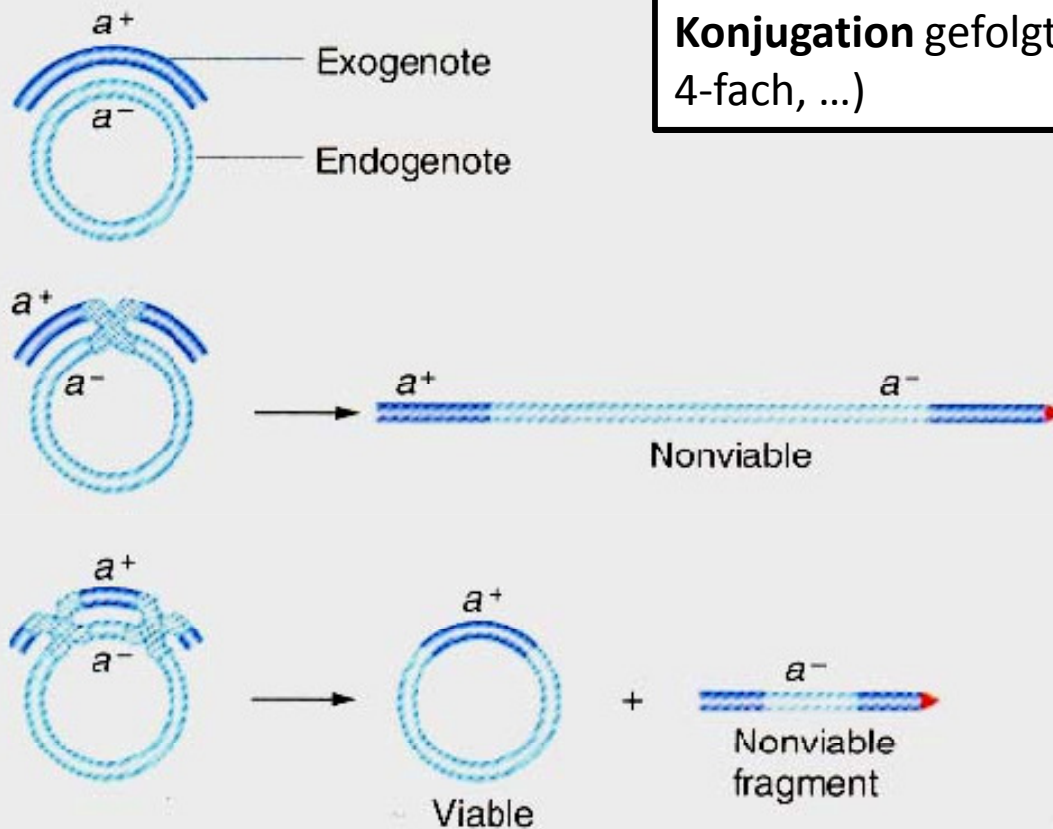
Wie?

B: Integration von Teilen des Genoms ins Chromosom einer Empfängerzelle:



Mechanismus:

Konjugation gefolgt von **Crossing-over** (2-fach, 4-fach, ...)



8. Welche Stämme entstehen bei folgenden Kreuzungen?

$F^+ \times F^- \rightarrow F^+ + F^+$

$Hfr \times F^- \rightarrow Hfr + F^-$

$F' \times F^- \rightarrow F' + F'$

9. In E. coli übertragen vier verschiedene Hfr Stämme die aufgelisteten Marker in der dargestellten Abfolge:

Stamm 1: Q W D M T

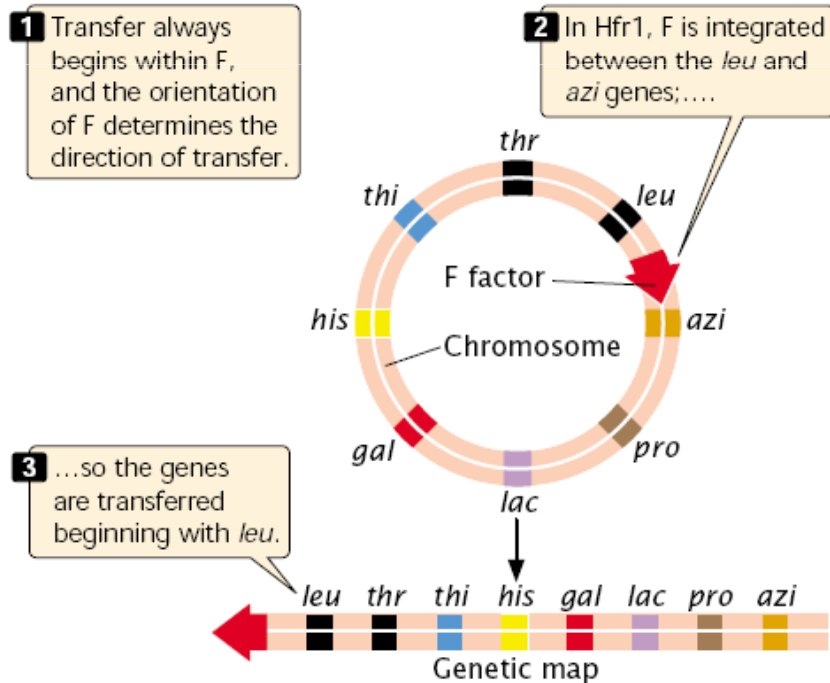
Stamm 2: A X P T M

Stamm 3: B N C A X

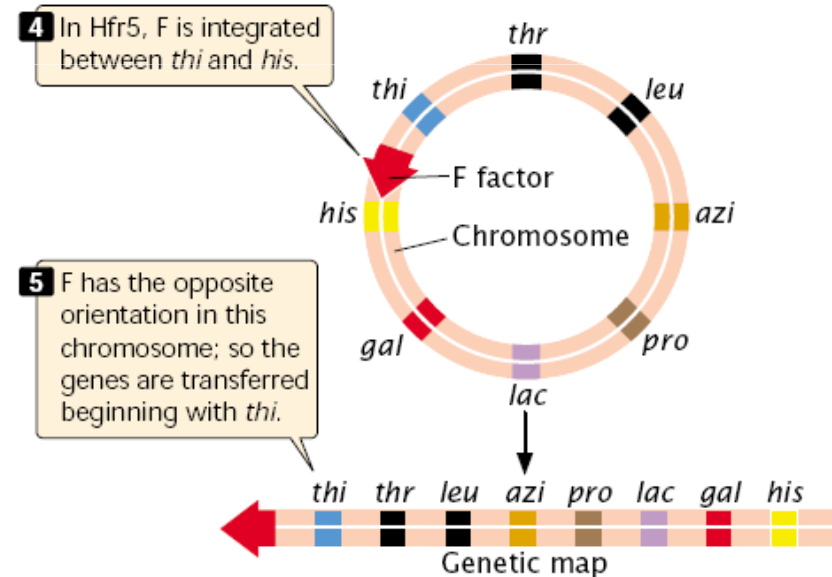
Stamm 4: B Q W D M

Bestimmen Sie die Abfolge der Gene/Marker auf dem circulären Chromosom.

(a) Hfr1

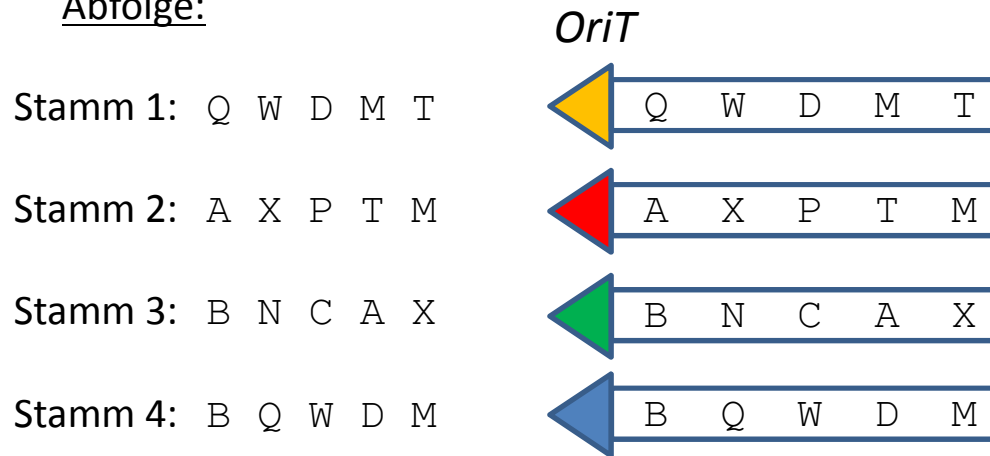


(b) Hfr5

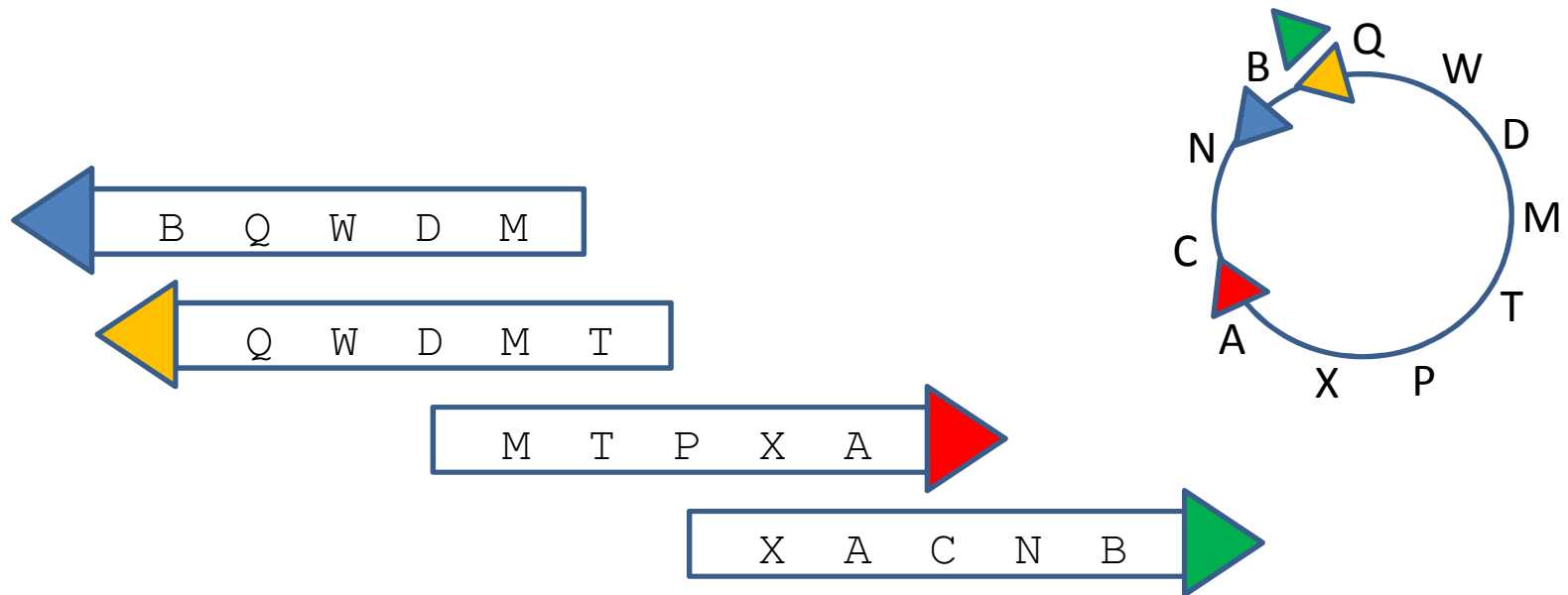


The orientation of the F factor in an Hfr strain determines the direction of gene transfer.
Arrowheads indicate the origin and direction of transfer.

9. In *E. coli* übertragen vier verschiedene Hfr Stämme die aufgelisteten Marker in der dargestellten Abfolge:



Bestimmen Sie die Abfolge der Gene/Marker auf dem circulären Chromosom.



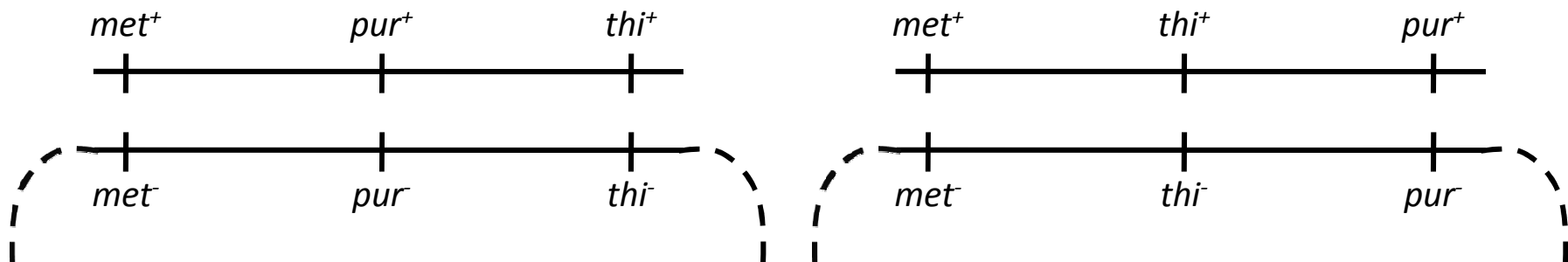
11. Sie kreuzen einen Hfr Stamm ($met^+ thi^+ pur^+$) mit einem F⁻ Stamm ($met^- thi^- pur^-$). Das Unterbrechen der Kreuzung an verschiedenen Zeitpunkten zeigte, dass met^+ zuletzt in die Empfängerzelle gelangt. Rekombinanten werden auf Medium ohne Methionin selektiert. Es treten folgende Genotypen auf:

$met^+ thi^+ pur^+$	280
$met^+ thi^+ pur^-$	0
$met^+ thi^- pur^+$	6
$met^+ thi^- pur^-$	52

- Warum enthielt das Selektionsmedium kein Methionin?
- In welcher Reihenfolge liegen die Gene vor?
- Was sind die genetischen Abstände in Rekombinationseinheiten?

- met^+ ist der letzte Marker, der in die Empfängerzelle transferiert wird
- Selektion auf met^+ stellt sicher, dass alle anderen Loci dieser Kreuzung bereits transferiert wurden
- alle thi^- oder pur^- Genotypen müssen demnach durch Rekombination entstanden sein

da met^+ als letztes transferiert wird, sind nur 2 Folgen möglich:



- eine der 4 möglichen Rekombinantenklassen benötigt neben den 2 Cross-overs zur Integration der transferierten DNA zwei weitere Cross-over Ereignisse

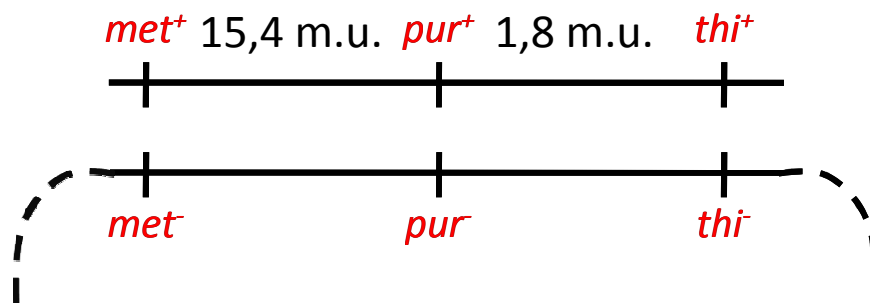
met⁺ thi⁺ pur⁺ 280

met⁺ thi⁺ pur⁻ 0



met⁺ thi⁻ pur⁺ 6

met⁺ thi⁻ pur⁻ 52

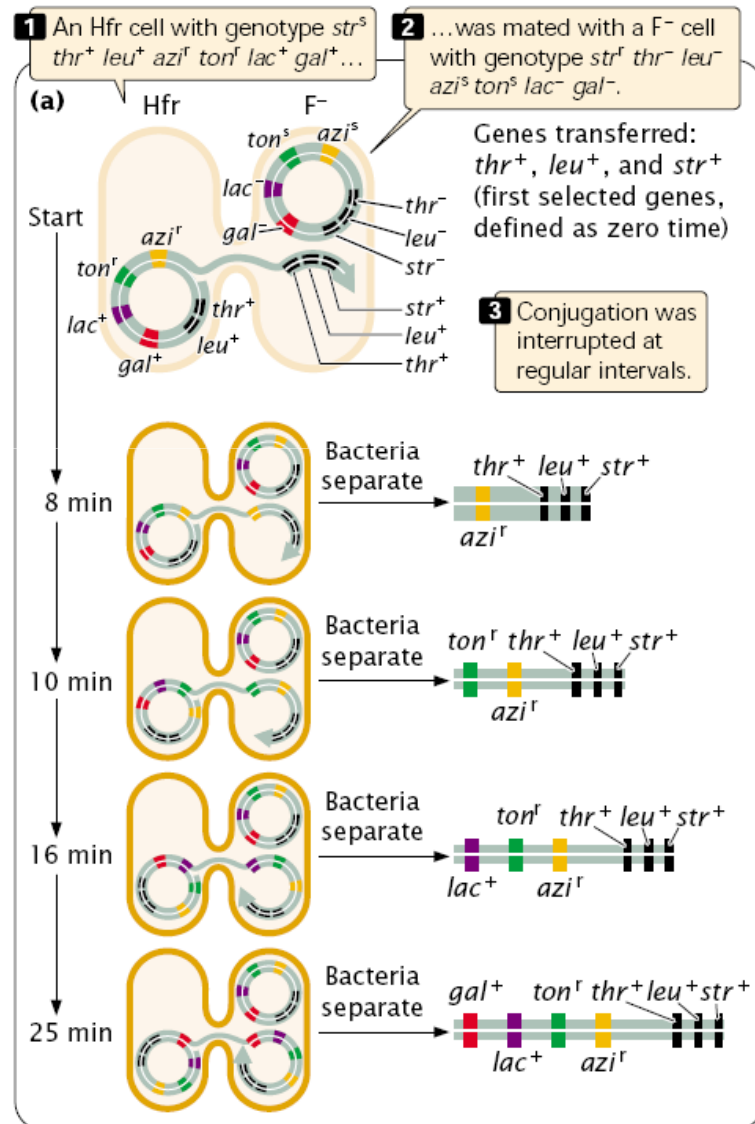


N = 338

met⁺ pur⁻ thi⁻ = 52/338 = 15,4 m.u.

met⁺ pur⁺ thi⁻ = 6/338 = 1,8 m.u.

10. In einer Kreuzung ($Hfr \times F^-$) ist leu^+ der erste Marker der übertragen wird. Die lineare Abfolge der anderen Marker ist unbekannt. Der Hfr Stamm ist für alle Marker prototroph, während der F^- Stamm für alle untersuchten Marker auxotroph ist. Welches ist die Abfolge der Marker wenn auf leu^- selektiert wird? Von den untersuchten Individuen sind 27% ile^+ , 13% mal^+ , 82% thr^+ und 1% trp^+ .



- je näher Marker an *Ori*, desto höher Wahrscheinlichkeit des Transfers
 - spontane Bruchpunkte kreieren einen natürlichen Transfergradienten
- Die Frequenz von Rekombinanten ist eine Funktion der Anordnung im Verhältnis zum *Ori* für jeden Marker

→ Reihenfolge = leu^+ - thr^+ - ile^+ - mal^+ - trp^+